

## ***Szakmai zárójelentés dr Pár Gabriella***

### ***„ A krónikus hepatitis C vírus infekcióhoz társuló elégtelen celluláris immunválasz pathogenezeise”***

A hepatitis C vírus (HCV) nagy közegészségügyi probléma. A világon jelenleg mintegy 170-200 millióra becsülik a hepatitis C vírus (HCV) hordozók számát. A HCV fertőzés az esetek mintegy 60-80%-ban válik krónikussá, és okoz idült hepatitist, cirrhosist és hepatocellularis carcinomát. A HCV infekció kimenetelét, az antivirális kezelésre adott válasz minőségét mind a vírus tulajdonságai (pl. genotípus, RNS titer), mind a gazdaszervezet (pl. genetika, nem, életkor, obesitás, alkohol fogyasztás, vasforgalom ) determinálja. A gazdaszervezet immunválasza meghatározó jelentőségű mind a vírus replikáció kontrollja és a gyógyulás, mind a krónikus hepatitis és a májcirrhosis pathogenezeise szempontjából. Tekintettel, hogy a jelenleg alkalmazott PEG-IFN + ribavirin kezeléssel a krónikus C hepatitises betegek kevesebb mint felénél (Magyarországon 31-44 %-nál ) érhető el tartós vírusmentesség, további antivirális illetve immunmoduláns szerek intenzív kutatása folyik Világszerte.

Krónikus C hepatitisben a vírus perzisztenciára magyarázatul szolgál egyrészt a vírus nagy mutációs rátája, és HCV-glikoprotein burok hypervariabilitása, másrészt mind a természetes immunválasz (NK, dendritikus sejtek), mind a szerzett immunválasz (cytotoxicus T-sejtek, T helper-sejtek) elégtelensége. Munkacsoportunk közel egy évtizede tanulmányozza a krónikus C hepatitisben az elégtelen immunválasz hátterében feltételezhető mechanizmusokat.

Korábbi vizsgálatainkkal kimutattuk hogy krónikus HCV hepatitises betegek *természetes ölősejt (NK) aktivitása alacsonyabb* az egészséges kontrollok, a tünetmentes HCV RNS pozitív vírus hordozók illetve az IFNa kezelésre gyógyult betegek NK aktivitásához képest. Igazoltuk hogy krónikus C hepatitisben számos cytotoxikus aktivitású sejt populáció (*CD3-CD8dim+ NK, Vd2/Vg9TcR+ gamma-delta T, perforin pozitív cytotoxicus T sejtek*) *szignifikánsan alacsonyabb* százalékban van jelen a perifériás vérben.

Az elégtelen cytotoxicus aktivitás hátterében álló pathomechanizmusok pontosabb megértése érdekében elmúlt években további kiterjesztett immunfenotípus vizsgálatok történtek. (regulatorikus T sejtek, CD3-CD56dim+ és bright+ NK sejtek, CD81 HCV receptor, különböző KIR és KAR analízise) Emellett lymphocyták, monocyták, NK sejtek cytokintermelését is tanulmányoztuk. Mágnes gyönggyel szeparált NK sejtek aktivitását ill. azt befolyásoló tényezőket funkcionális tesztekkel vizsgáltuk hepatitis C vírus fertőzés különböző formáiban. Vizsgálatainkkal a vírus ellenes kezelésre adott választ előrejelző immunmarkereket is kerestünk.

#### ***1. Lymphocyta fenotípus meghatározások, HCV koreceptor CD81 expressziós vizsgálatok krónikus HCV infekció különböző formáiban.***

Krónikus HCV hepatitises betegeknél emelkedett regulatorikus (CD4+CD25+high) T sejt arányt, csökkent cytotoxicus CD3-CD56dim+ NK sejt arányt észleltünk egészséges kontrollcsoporthoz képest. Normál GPT-jű tünetmentes HCV hordozóknál az aktivált CD25+ T sejtek aránya emelkedett volt a többi betegcsoporthoz viszonyítva, NK sejtek eloszlása és aktivitása az egészséges kontroll csoporthoz képest nem tért el.

Az NK sejtek aktivitását gátló HCV koreceptor -CD81-molekula expresszióját is tanulmányoztuk NK sejteken hepatitis C vírus infectio különböző formáiban (tünetmentes, tartósan normális transaminase értékekkel járó vírushordozóknál, krónikus C hepatitiseseknél illetve HCV cirrhosisban). Kontroll csoportként egészséges véradókat vizsgáltuk. Irodalmi adat hogy a vírus CD81 receptorhoz kötődve B sejt aktivációt indukál, így a fenti betegeknek a CD81 molekula expresszióját T és B sejteken is vizsgáltuk. Krónikus C hepatitisben a peripheriás vér NK és B sejtjeinek (HCV koreceptor) CD81 overexpresszióját igazoltuk, amely szerepet játszhat egyrészt az elégtelen NK aktivitásban, másrészt -a B sejtek aktivitációja révén- a HCV fertőzéshez társuló autoimmunitás és lymphoproliferáció kialakulásában. Az NK sejtek aktivitását gátló CD81 receptor csökkent expresszióját mutattuk ki tünetmentes HCV hordozókon az aktív betegekhez képest, mely magyarázatul szolgálhat a tünetmentes hordozók normális NK aktivitáshoz. A terápia előtti CD81 expresszió nem volt prediktív a kombinált antivirális terápiára adott válaszkészség tekintetében. Ugyanakkor a CD81 expresszió szignifikánsan magasabb volt a korábban IFN + Ribavirin kezelésben részesült, terápiára nem reagáló betegcsoportban a tartós virológiai választadókhoz képest. Az IFN + Ribavirin terápia az NK aktivitás növelésével egyidőben mind NK, mind B sejteken a CD81 expresszió csökkenését okozta a terápiára reagáló betegcsoportban. Fenitek alapján feltételezhetjük hogy a peripheriás vér B és NK sejtjeinek CD81 receptor expressioja kulcsszerepet játszhat a HCV infekció kimenetelében és az IFN-ra adott válaszkészségben.

## ***2. Th1/Th2 cytokin profil vizsgálatok krónikus C hepatitisben***

Míg a T helper1 (Th1) típusú cytokinek alapvető fontosságúak a gazdaszervezet vírus ellenes celluláris immunválaszában addig a Th2 cytokinek főként a humoralis immunválasz kialakulásában, a cytotoxicitás gátlásában játszanak szerepet, így fokozott termelésük különböző vírusfertőzések krónikussá válásához vezethet. Krónikus C hepatitisben a Th1/Th2 cytokinek arányát, illetve a kombinált antivirális terápia hatását vizsgáltuk. LPS stimulált monocyták és PMA-ionomycin stimulált T sejtek felülúszójából FACS microbead assay-el határoztuk meg azok IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 (Th1) és IL-4, IL-6, IL-10 (Th2) koncentrációját az antivirális terápiát megelőzően illetve a kezelés 1, 3, és 6. hónapjában.

Az antivirális terápiát megelőzően a T sejtek IFN $\gamma$  termelése szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult krónikus hepatitisben mind a későbbiekben terápiára nem reagálók mind a későbbiekben tartós virológiai válaszadók esetében az egészséges kontrollokhoz képest. Ugyanakkor a monocyták antivirális terápiát megelőző IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 termelése szignifikánsan magasabb volt a későbbiekben tartós virológiai válaszadóknál a terápiára nem reagálókhöz és az egészséges kontrollokhoz képest. Míg a monocyták IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  termelését az antivirális terápia a virológiai választól függetlenül csökkentette, addig a T sejteken az IL-2, IFN $\gamma$  termelés szignifikánsan fokozódott a terápiára virológiai választadóknál. Az antivirális terápiát megelőző IL-10 termelést szignifikánsan magasabbnak találtuk a terápiára későbbiekben nem reagáló csoportban a terápiára vírusmentessé válók és az egészséges kontroll csoporthoz képest.

Kimutattuk, hogy krónikus C hepatitisben az antivirális terápiára reagálóknál a T sejteknél észlelt elégtelen Th1 cytokin termelést a monocyták kifejezett IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  cytokin termelése képes ellensúlyozni és feltehetőleg ezáltal hatékony celluláris immunválaszt indukálni. A terápiára nem reagálóknál Th2-es típusú cytokin profilt észleltünk. Monocyták LPS-indukált TNF termelése prediktív volt az antivirális kezelésre adott válasz tekintetében. A monocyták IL-10 termelése korrelált a HCV RNS szintekkel, de fordított arányban volt a májbiopsia által leírt gyulladáshoz (HAI-val). A T-sejtek esetén is negatív volt a korreláció a Th2 cytokin IL-10 és IL-4 termelés valamint a hisztológiai aktivitás között.

Az IFN + ribavirin kezelés a Th1-es cytokinek termelését a terápiára vírusmentessé válókön fokozta, mely alapvető szerepet játszhat a HCV elleni hatékony celluláris immunválasz indukciójában.

Krónikus C hepatitisben (szemben az egészséges kontrollokkal és a tartós virológiai választ mutató egyénekekkel) az endogén IFN-g termelés indukáló, NK aktivitást fokozó cytokin, az IL-18 termelése is szignifikánsan csökkent.

### **3. IFN+ ribavirin kezelés immunológiai hatásai:**

Krónikus C hepatitisben a lymphocyták IFN-g termelése szignifikánsan alacsonyabb, IL-10 termelése magasabb volt az egészséges kontrollokhöz képest. Az antivirális IFN + ribavirin kezelés a lymphocyták IFNg termelését fokozta, illetve a humorális immunválaszban fontos IL-10 termelését illetve a gyulladásos folyamatokban fontos IL-6 termelést gátolta. A lymphocyták IL-6 termelése a májbiopszia által leírt gyulladásos aktivitással (HAI) korrelált. A lymphocyták Th2-es cytokin, IL-10 termelése fokozottabb volt a terápiára nem reagáló csoportban, a vírusmentessé válókhoz képest. Az IFN + RBV kezelés T-sejtek IL-2 és a monocyták IL-6 és TNF termelésének fokozódásához vezetett a jól válaszolóknban, de nem a non-responderekben.

Kimutattuk, hogy krónikus C hepatitisben csökkent a peripheriás vér perforin-pozitív CD3+ T lymphocytáinak aránya a tünetmentes HCV hordozókhoz képest. IFN+RBV kezelésre a perforin-pozitív sejtek száma emelkedett. A terápia befejezése után a perforin expresszió a nem reagálóknál a kezelést megelőző alacsony szintre csökkent, szemben a HCV RNS negatívvá válókkal.

Igazoltuk, hogy krónikus C hepatitisben a peripheriás vér NK és B-sejtjein a HCV-co-receptor CD81 „overexpressziója” áll fenn, míg ez csökkent tünetmentes HCV hordozókban. Az IFN+RBV mind az NK-sejtek, mind a B-sejtek CD81 expressziójának csökkenését okozta a responderekben. A terápiát követően a CD81 expresszió szignifikánsan magasabb volt a nem reagálóknban, mint a virológiai válaszadóknban.

Normális GPT-jü, tünetmentes HCV hordozóknál, illetve a tartós virológiai válaszadóknál szignifikánsan magasabb NK aktivitást találtunk az aktív betegekhez képest. Az IFN+RBV kezelés az NK aktivitás, a perforin expresszió és a T-sejtek Th1-es cytokin termelésének fokozása, illetve a CD81 co-receptor expresszió gátlása révén a kezelésre jól reagálóknban hatékony HCV elleni celluláris immunválasz indukál.

Összegezve, HCV infekcióban a PEG-IFN+RBV terápia a korai válaszadók monocytáinak fokozott Th1-es típusú cytokin termelését indukálta, hasonlóan a rapid virológiai válaszadók kezelést megelőzően kimutatható Th1-típusú cytokin dominanciájához. Feltételezhető hogy mind a rapid, mind a korai virológiai válasz kialakulásának a természetes immunválasz aktivációja (monocyták TNF $\alpha$ , IL-6 termelése) és a HCV elleni hatékony Th1 immunválasz a feltétele. Leleteink alapján felvetettük, hogy a PEG-IFN +RBV kezelésre nem reagáló HCV betegek terápiás lehetőségeként hasznos lehet a monocyták Th1-es cytokin termeléséért felelős jelátviteli utakat aktiváló szerek (TLR3 ligand, TLR9-CPG10101) kombinálása az eddig alkalmazott PEG-IFN+ RBV kezeléssel.

### **4. Rapid virológiai válasz (RVR) immunológiája**

A legújabb adatok szerint az anti-HCV kezelés kimenetele prognosztizálható az első 4 hetes terapiára bekövetkező vírus-elimináció (rapid virológiai válasz) alapján, mivel PEG-IFN + ribavirin kezelése során a 4. hétre bekövetkező HCV RNS negativitás a tartós virológiai válasz fő prediktora. Azonban az IFN kezelés 24. hetében is HCV-pozitív betegek gyógyulására minimális az esély. A rapid virológiai válasz immunológiájával kapcsolatban PEG-IFN kezelés 4. hetétől kezdődően észleltek fokozott HCV specifikus CD4 és CD8 T sejt választ a rapid virológiai válaszadók csoportjában a lassan reagáló un. slow responderekhez képest. Továbbá PEG-IFN kezelés hatására az Interferon Stimulált Gének (ISG-k: OAS, MxA, PKR) és TLR7 fokozott expresszióját észlelték RVR esetén a korai válaszadók (EVR) illetve a kezelésre nem reagálókhoz (non-responderokhoz) képest.

A RVR immunológiai hátterének további tisztázása céljából megvizsgáltuk, hogy krónikus C hepatitises betegeknél a PEG-IFN kezelést megelőzően kimutatható-e különbség a rapid virológiai válaszadók (RVR) a korai virológiai válaszadók (EVR) és a nonresponderok (NR) között a perifériás mononukleáris sejtek fenotípusában illetve az TLR4 agonista LPS által stimulált monocyták és a PMA+ionomycin aktivált lymphocyták cytokin termelésében? Továbbá, tanulmányoztuk, hogy a PEG-IFN + RBV terápia milyen hatással van a fenti paraméterekre az egyes betegcsoportokban. Perifériás mononukleáris sejtek fenotípus vizsgálata (CD4, CD8, Treg, CD56, CD19, CD14), ill. LPS (TLR4 agonista) stimulált monocyták, PMA+ionomycin stimulált lymphocyták TNF $\alpha$ , IL6, IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL10 cytokintermelésének meghatározása FACS CBA assay-el történt.

Igazoltuk hogy krónikus C hepatitisben az IFN +RBV terapiára rapid virológiai válasszal reagálóknál LPS hatására (toll-like receptor 4 stimulálására) a perifériás vér monocytái jelentős TNF $\alpha$  és IL-6, a lymphocyták fokozott IFN $\gamma$  és csökkent Th2 cytokin (IL-4, IL-10) képzést mutatnak. Mindez az antivirális terápia eredményességének előrejelzőjeként (predictoraként) szerepelhet, és figyelembevételével növelhető a kezelés költség-hatékonysága.

Adataink alapján a rapid virológiai válasz kialakulásának a monocyták megfelelő aktivációja a feltétele. Tekintettel, hogy a TLR3/TLR4 közös jelátviteli úton keresztül indukál IFN $\beta$  termelést, az interferonra adott válaszképtelenség hátterében a dsRNS érzékelő TLR3 keresztüli szignál mechanizmus elégtelensége feltételezhető. Eredményeink alapján, ha a HCV IFN kezelés 4. hetére nem érhető el HCV RNS negativitás, terápiás lehetőségként a monocyták Th1 cytokintermeléséért felelős jelátviteli utakat (TLR3, TLR9- CPG10101) aktiváló szerek alkalmazása hasznos lehet.

### ***5. NK és cytotoxicus T sejt aktivitást befolyásoló inhibitoros és activator receptor expresszió (KIR/KAR)***

A természetes ölösejtek aktivitása az aktivációs és gátló receptorokon keresztüli szignál mechanizmusok egyensúlyának függvénye. Krónikus C hepatitisben észlelt elégtelen természetes ölösejtaktivitás hátterében mind bizonyos NK sejt aktivitást gátló receptorok (pl. NKG2A) fokozott, mind aktivátoros (NKp30, NKp46) receptorok csökkent expresszióját igazolták a közelmúltban. Jelen munkánkban további – mostanáig nem analizált - inhibitoros (KIR2DL3, KIR3DL1, ILT2) illetve aktivátor (KAR-CD160, NKG2D, NKG2C) receptorok

expresszióját vizsgáltuk HCV fertőzés különböző formáiban. Tekintettel hogy a regulatorikus T sejtek által termelt TGFbeta ismertén csökkenti különböző killer aktivátor receptor expresszióját, regulatorikus T sejt arány, plazma TGFbeta szintek és aktivátor illetve inhibitoros receptorok expressziója közötti összefüggést is tanulmányoztuk. In vitro TGFbeta kezelés NK cytotoxicitásra, KIR/KAR expresszióra kifejtett hatását is vizsgáltuk.

21 krónikus C hepatitises, 11 normál GPT-jű HCV RNS pozitív vírushordozó, 15 egészséges kontrollt vontuk be. Perifériás vér CD4+CD25high+ regulatorikus T sejtjeinek, KIR2DL3, ILT-2, KIR3DL1, CD160, NKG2D, NKG2C expresszáló NK, T és NKT sejtjeinek százalékos arányát, illetve NK sejt aktivitást flow cytometriai módszerrel határoztuk meg. A krónikus C hepatitis diagnózisát (6 hónapja fennálló emelkedett szérumszintű GPT és HCV RNS pozitivitás mellett) szövettani vizsgálat is megerősítette.

Plazma TGFbeta szintek mérése ELISA-val történt.

Krónikus C hepatitisben az NK sejtek fokozott KIR2DL3 inhibitoros receptor expresszióját és csökkent CD160 ill. NKG2D aktivátoros receptor expresszióját észleltük az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Továbbá a CD8+ cytotoxicus sejtek CD160, NKG2D, NKG2C aktivátor receptor expressziója is csökkent krónikus C hepatitises betegeknél, míg a normál GPT-jű vírushordozók esetében ez nem volt kimutatható. Plazma TGFbeta szintek és az NKG2D expresszió között fordított arányosság volt kimutatható. In vitro TGFbeta kezelés mind az NK aktivitást, mind az NKG2D killer aktivátor receptor expressziót gátolta. Tekintettel hogy a TGFbeta a többi KIR/KAR expresszióját nem befolyásolta, HCV fertőzés során további KIR/KAR expressziót szabályozó mechanizmusok jelenléte is felmerül. Összefoglalva a krónikus C hepatitisben ismert elégtelen cytotoxicus immunválasz hátterében csökkent killer aktivátor, illetve fokozott killer inhibitor receptor expressziót észleltünk a természetes ölüsejteken, T sejteken illetve az NKT sejteken. A csökkent aktivátor receptor expresszióért részben az emelkedett TGFbeta termelés volt a felelős.

Összefoglalva, krónikus C hepatitisben ismert elégtelen cytotoxicus immunválasz hátterében csökkent killer aktivátor, illetve fokozott killer inhibitor receptor expressziót észleltünk természetes ölüsejteken, T sejteken illetve NKT sejteken. A csökkent aktivátor receptor expresszióért részben az emelkedett TGFbeta termelés volt a felelős.

Eredményeink alapján azt is felvetettük, hogy az IFN +RBV antivirális kezelésre nem reagáló HCV infekció új típusú immunmoduláns terapiája a jövőben alapulhatna egyrészt TGFbeta antagonisták, solubilis NKG2D ligandok, másrészt toll-like receptor agonisták alkalmazásán. Ilyen irányú kutatások már folyamatban vannak.

Vizsgálataink újabb adatokat szolgáltatnak a HCV fertőzés immunpatogenezisének jobb megismeréséhez, amely feltétele az előrehaladásnak a hatékony antivirális kezelés és a HCV vakcináció problémájának megoldásában.